

Mainx 1973.

R. Shimshoni -

Aus der Abteilung für Experimentelle Endokrinologie
der Universitäts-Frauenklinik der Johannes Gutenberg-
Universität Mainz

Penetration von Erythrocyten durch De-
hydroepiandrosteron und seine Konjugate

INAUGURALDISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz,
den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von
Raphael Shimshoni
aus Tel-Aviv

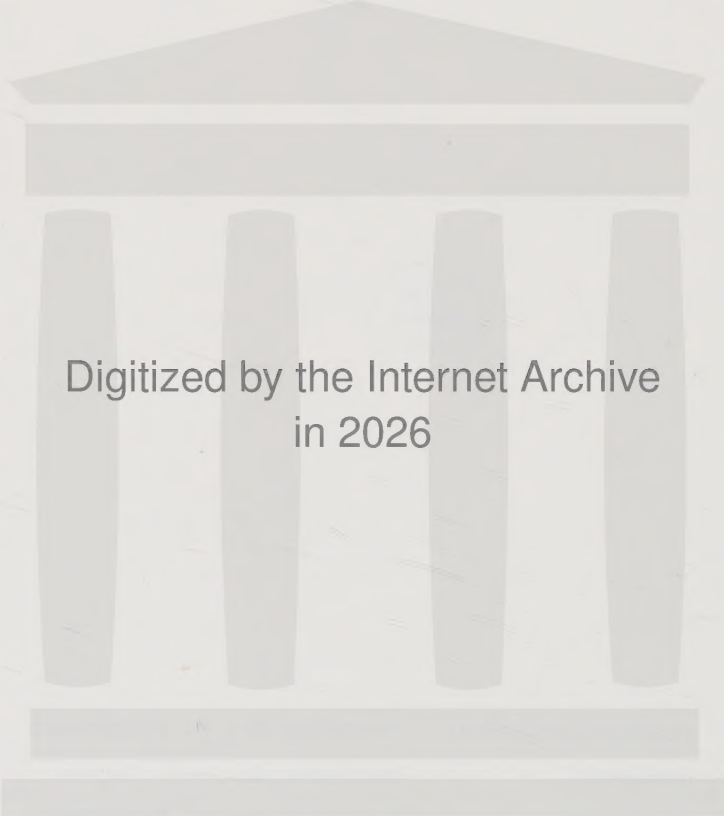
MAINZ 1973



Fachbereichsdekan: Professor Dr. H. Langendorf

Referent: Professor Dr. G.W. Oertel

Korreferent: Professor Dr. V. Friedberg



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Einleitung	1
1.1. Physiologie der Erythrocyten	1
1.2. Dehydroepiandrosteron	6
1.3. Glucoso-6-phosphat-dehydrogenase	15
II. Problemstellung	19
III. Material und Methodik	20
3.1. Verwendete Abkürzungen	20
3.2. Trivialnamen und chemische Bezeichnung der in dieser Arbeit vorkommenden Steroide	20
3.3. Herkunft der Materialien	21
3.4. Gewinnung der Erythrocyten	21
3.5. Inkubationsverfahren	22
3.6. Extraktion der freien Steroide und seine Steroidkonjugate	23
3.7. Dünnschichtchromatographie der C ₁₅ - Steroide auf dem Kieselgel G	25
3.8. Bestimmung der Glucoso-6-phosphat- dehydrogenase	26
3.9. Messung der Radioaktivität	27
IV. Ergebnisse	28
V. Diskussion	32
VI. Zusammenfassung	36
VII. Literaturverzeichnis	37

I. EINLEITUNG

1.1. Physiologie der Erythrocyten

Man kann die Erythrocyten als ein eigenes Gewebe ansehen, dessen Besonderheit darin besteht, daß es sich in ständiger Bewegung befindet und alle anderen Gewebe durchströmt. Die Hauptleistung der Erythrocyten für den Organismus besteht im Gastransport, d.h. in der Vermittlung der Sauerstoffzufuhr und der CO_2 -Abgabe. Für diese Aufgaben sind die Zellen spezialisiert durch ihren großen Hämoglobingehalt, durch die hohe Aktivität

Bestandteile	Gehalt	
	[g/100 ml]	[mmol/l]
Wasser	65	
feste Bestandteile	35	
Hämoglobin	33	5
Nichthämoglobinprotein	~ 1	
Lipoide	0,5	
Glutathion	~ 0,1	2—3
ATP — ADP		3
2,3-Phosphoglycerat		4—5

Abb. 1 Zusammensetzung der Erythrocyten

der Carboanhydrase und durch die Gegenwart spezieller Mechanismen, die das Hämoglobin funktionstüchtig erhalten (74, 28).

Der reife Erythrocyt ist seiner Gestalt nach ein bikonkaves Scheibchen, dessen flüssiger Inhalt von einer Membran umschlossen ist. Diese enthält Eiweiße, Phosphatide und Mucopolysaccharide, die ihr spezifische Eigenschaften verleihen. Die Mucopolysaccharide befinden sich in der äußersten Schicht der Zellmembran. Zu ihnen zählen die Neuraminsäure-haltigen Mucoiden (7, 93) die

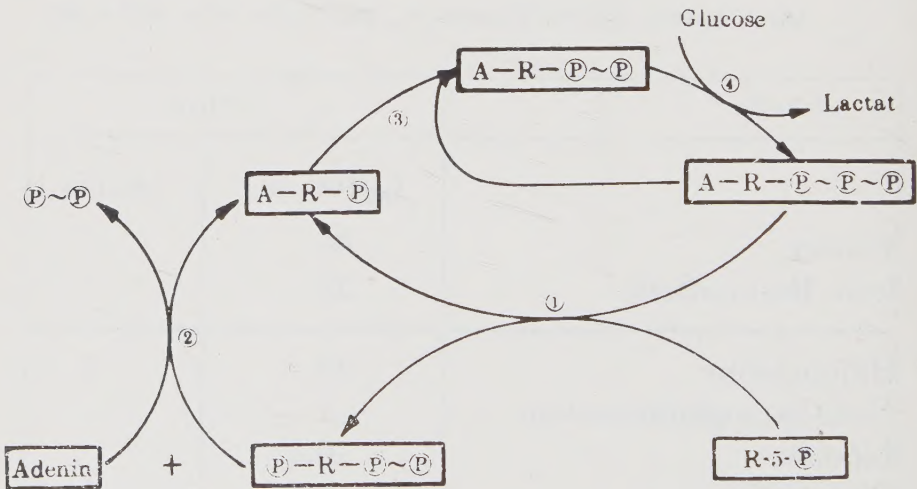


Abb. 2 ATP-Synthese im Erythrocyten (nach YOSHIKAWA)

der roten Blutzelle ihre elektrische Oberflächenladung verleihen. Das Stroma besteht überwiegend aus der Zellmembran und in kleinerem Ausmaß aus den Innenstrukturen. Der Überstand enthält das Hämoglobin sowie die Enzyme der Glykolyse, des Pentosephosphatcyklus usw.

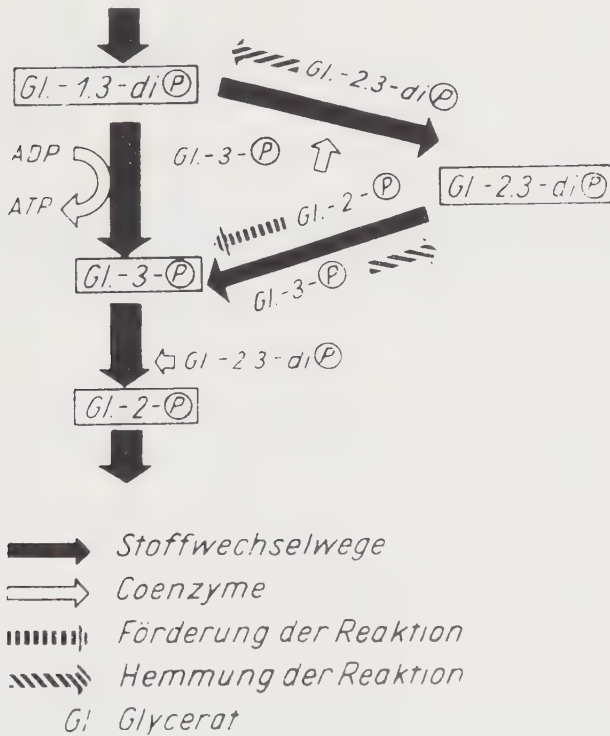
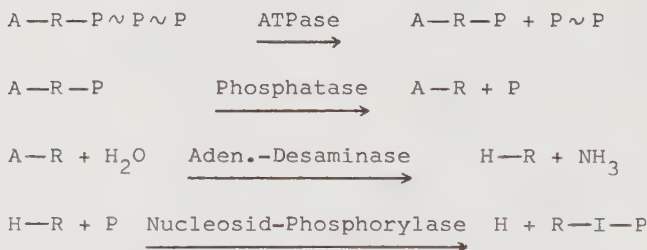


Abb. 3 Phosphoglyceratcyklus in roten Blutzellen

Der Stoffwechsel der reifen Erythrocyten zeigt eine Anzahl von Besonderheiten. Die wichtigste besteht darin, daß die Energielieferung vorwiegend anaerob erfolgt, wobei als Substrat allein die Glukose verwertet wird. Die Stoffwechselleistungen dienen zur Aufrechterhaltung der Zellstruktur, Erhaltung des Hämoglobins im Funktionszustand, der spezifischen Zusammensetzung der organischen Bestandteile, Aufrechterhaltung von Konzentrationsunterschieden der Kationen zwischen Erythrocyten und Plasma (41). Die Schlüsselsubstanz für die Aufrechterhaltung von Stoffwechsel, Struktur (YOSHIKAWA) und Ionenzusammensetzung (STRAUB) ist das ATP, das im Verlauf der Glykolyse erzeugt wird.

Der Abbau der ATP erfolgt nach folgendem Schema:



Die mittlere Lebensdauer der Erythrocyten beträgt etwa 100 Tage. Dieser Wert wurde anhand verschiedener Methoden ermittelt:

1. Serologisch nach ASHEY, sowie durch
2. Markierung mit Isotopen

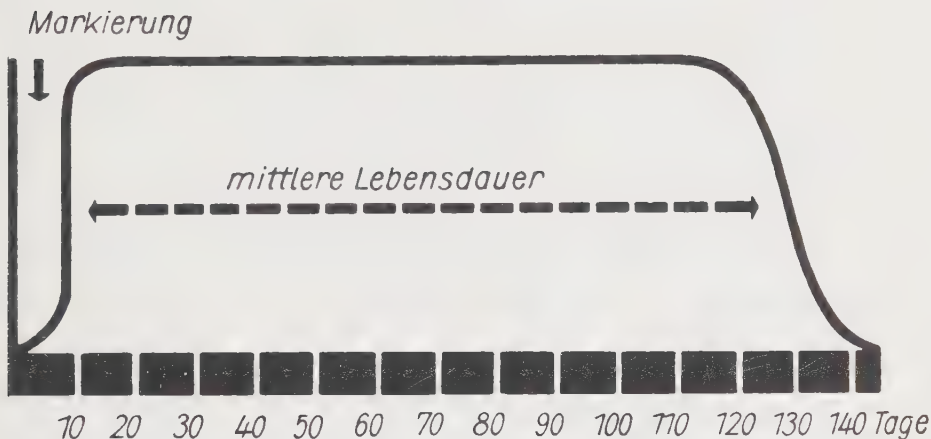


Abb. 4 Bestimmung der mittleren Lebensdauer
roter Blutzellen mit ^{15}N -Glycin (SHEMIN)

Über die Zerstörung und Alterung der Erythrocyten ist noch verhältnismäßig wenig bekannt. Anscheinend wirken die inneren Faktoren der Erythrocytenalterung mit äußeren Faktoren, wie den phagocytären Einwirkungen von Milz und retikuloendothelialelem System, zusammen (38).

1.2. Dehydroepiandrosteron (DHEA)

BUTENANDT isolierte das schwach androgene Hydroxyketon Androstenolon (3 β -Hydroxy-5-androsten-17-on) 1934 aus Urin zusammen mit einem inaktiven, ungesättigten Chlor-keton, das bei der Hydrolyse des Urins aus DHEA und Salzsäure entsteht. Der sterische Verlauf von Substitutionsreaktionen war damals noch nicht bekannt. BUTENANDT beobachtete, daß bei der Hydrierung, Acetylierung und Hydrolyse des ungesättigten Chlorketons Androsteron entsteht und schloß daraus, daß DHEA an C₃ die gleiche

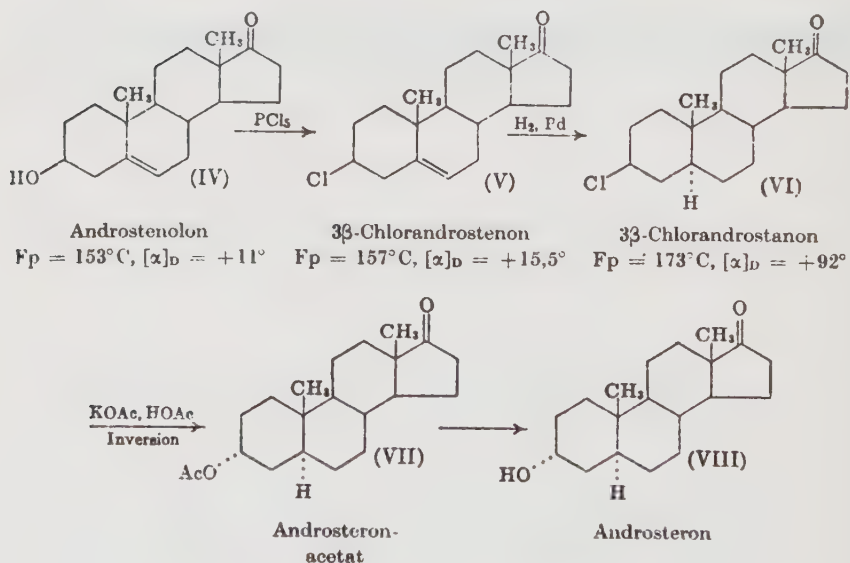


Abb. 5 Beziehung zwischen Androstenolon und Androsteron

Konfiguration haben müsse wie Androsteron. Er nannte diese Verbindung daher Dehydroandrosteron. Heute weiß man, daß die Verbindung sich biogenetisch vom Cholesterin und nicht von Androsteron oder seinem Epimer ableitet.

Das DHEA ist ein wichtiges Intermediärprodukt im Androgen- und Östrogen-Stoffwechsel. Es wird auch als "Vorhormon" für Androgene und Östrogene bezeichnet (4). Zwar ist seine physiologische Bedeutung heute noch nicht vollständig erkannt, doch scheint es der wichtigste physiologisch G-6-PDH Inhibitor zu sein. Weiterhin nimmt es eine zentrale Stellung im Stoffwechsel der Sexual-Hormone ein (4). DHEA findet sich im menschlichen Organismus in Ovar (54), Hoden (31,53), Nebenniere (31,53), Plazenta (82), Blutplasma (15,51,64,81,88), Mekonium (22) und Urin (14,20,30). Nach ACTH-Zufuhr steigt der Normalspiegel des DHEA's in Plasma und Urin an (3,4,16). Erhöhte DHEA-Konzentration treten auf bei:

STEIN-LEVENTHAL-Syndrom (25,43), LEYDIG-Zell-Tumoren (27) Nebennieren-Hyperplasie bzw. Carcinom (72).

Die Biosynthese des DHEA's verläuft über verschiedene Präkursoren, wie durch in-vivo oder in-vitro Untersuchungen nachgewiesen wurde. Hier sind zu nennen: Acetat, das als Präkursor von DHEA in der fetalen Nebenniere (8), in Nebennieren (9), im Nebennieren-

Carcinom (94) und im Ovar (54) beschrieben wurde. Cholesterin, welches in der fetalen Nebenniere (95), dem Nebennieren-Adenom (94) zu DHEA umgewandelt werden kann. Pregnenolon, dient als Präkursor bei der Biosynthese von DHEA in der Nebenniere (24), dem Nebennieren-Adenom (13,24) und dem Interstitial-Zelltumor des Hodens (27). 17 α -Hydroxy-pregnenolon ließ sich als Vorstufe des DHEA's in Hoden (31), Nebenniere (31) und Nebennieren-Adenom (77) nachweisen.

17 α ,21-Dihydroxy-pregnenolon ist nur in peripheren Geweben wie Muskel und Leber als Präkursor des DHEA's anzusehen (18, 19).

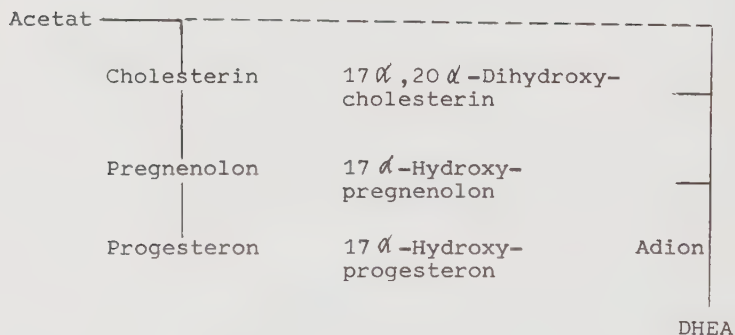


Abb. 6 Biosynthese des DHEA's

Theoretisch könnte DHEA weiter aus folgenden Steroiden gebildet werden: 17 α ,20 α -Dihydroxy-cholesterin oder

17 α ,20 α ,22-Trihydroxy-cholesterin (13,19) sowie Androstendiol (19). Physiologische Bedeutung besitzt das DHEA vor allem durch seinen Metabolismus zu Androgenen und Östrogenen. Es kann somit, wie schon erwähnt, als "Vorhormon" BAULIEU (4), für männliche und weibliche Hormone gelten. In allen Geweben mit

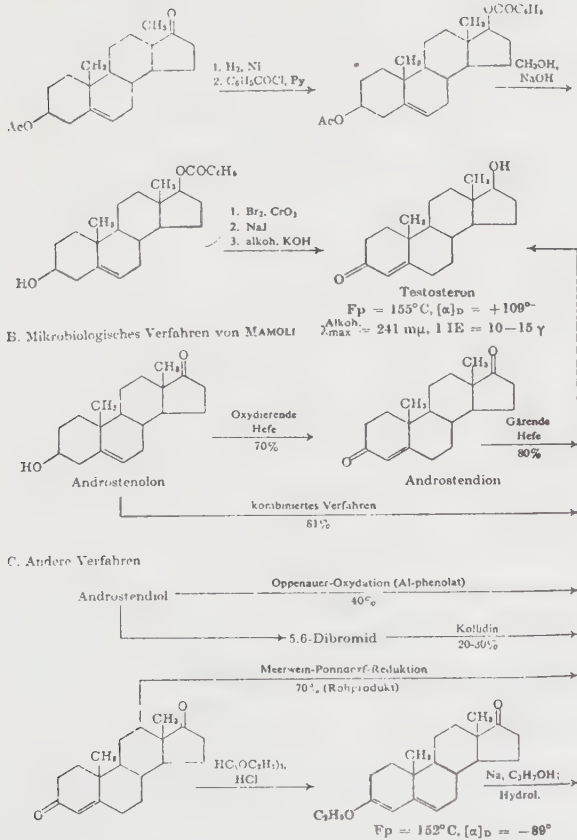


Abb. 7 Testosteron aus Androstenolon (BUTENANDT)

Androgen-Synthese verläuft die Bildung von Testosteron und Androstendion über Pregnenolon. In Testis (79,82), Ovar (33,85) und Nebenniere (75) treten als Intermediärprodukte Progesteron, 17α -Hydroxy-progesteron bzw. DHEA und Androstendiol auf (83). In normalem Hodengewebe ist allerdings auch eine direkte Testosteron-Synthese aus Progesteron über Testosteron-acetat möglich (19,21,34). Diskutiert wird ferner der Weg: Pregnenolon-Androstendiol --- Testosteron-Androstendion (19). In diesem Wgg kann zwischen Pregnenolon und Androstendiol noch 17α -Hydroxy-pregnenolon eingeschaltet sein (73). Weitaus wichtiger erscheint jedoch die Biosynthese von Androgenen über DHEA:

- a. In Ovar, Testis, Nebennieren und peripheren Geweben entsteht DHEA dabei direkt aus Cholesterin und wird über Androstendiol oder Androstendion direkt in Testosteron umgewandelt (19). Auf diesem Syntheseweg wird also Pregnenolon umgangen, das sonst als notwendiger Präkursor gilt.
- b. In Nebenniere und Testis ist der Weg 17α -Hydroxy-pregnenolon -- DHEA-- Androstendion -- Testosteron möglich (13, 24, 53, 84), während
- c. in peripheren Organen die Seitenkette an C_{17} des $17\alpha,21$ -Dihydroxy-pregnenolons abgespalten werden, wobei das entstehende DHEA analog zu b. über Androstendion in Testosteron überführt wird (13,19).

d. Diskutiert wird ferner die Reaktionsfolge:

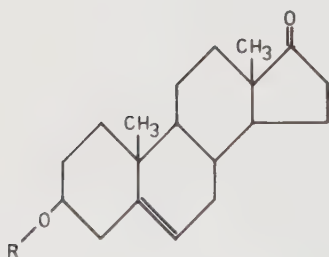
Pregnenolon -- Androstendiol -- DHEA -- Androstendion
-- Testosteron (19).

Die Östrogen-Synthese geht im allgemeinen von Testosteron oder Androstendion aus (1,29,97). Nach Umwandlung zu 19-Hydroxy-androstendion oder 19-Hydroxy-testosteron (19) kann nach weiterer Oxydation und Entfernung von C₁₉ die Aromatisierung des Ringes A eintreten unter Entstehung von Östron oder Östradiol. Daneben aber ist auch eine Biosynthese aus DHEA möglich (26,78), die über 19-Hydroxy-DHEA verläuft. Nach BAULIEU (4) ist DHEA in der Plazenta der wichtigste Präkursor für Östrogene. DHEA wird hier-
nach einmal über Androstendion und 19-Hydroxy-androstendion in Östron oder aber über 16 α -Hydroxy-DHEA, Androstentriol und 19-Hydroxy-androstentriol, die in der Leber entstehen und auf dem Blutwege in die Plazenta gelangen, in Östriol umgewandelt (4,17).

In wieweit die beschriebenen Reaktionen des DHEA's quantitativ abhängig sind von seiner Konjugation mit Schwefelsäure, ist noch nicht völlig geklärt. Bewiesen wurde aber, daß der größte Teil des DHEA's von der Nebenniere in Form eines Sulfokonjugates ins Blutplasma abgegeben wird (4). Steroid-Sulfokonjugate stellen also nicht nur Ausscheidungsprodukte dar, sondern können als inaktive Vorstufen von aktiven Hormonen Bedeutung er-

langen.

Nach jüngeren Untersuchungen besitzt das endogene sulfokonjugierte DHEA lipophilen Charakter (3,57). Im menschlichen Blut ist das Konjugat offenbar an Protein der Albuminfraktion (Postalbumin) gebunden (60). Aus dem Darm wird DHEA-sulfat wohl nicht als Anion, sondern erst nach Überführung in sogenanntes Sulfatid resorbiert (36). Nach Oertel erfolgt die Umwandlung oral oder parenteral verabreichten DHEA-sulfats in DHEA-sulfatid verhältnismäßig rasch (Abb. 8). Versuche, das im Organismus gelegentlich fehlende DHEA-sulfatid durch externe Zufuhr von DHEA-sulfat zu ergänzen, lassen sich aufgrund einer beinahe vollständigen Resorption aus dem Darm (23) und eines beachtlichen enterohepatischen Kreislaufs sulfokon-



3β-Hydroxy-5-androsten-17-on

Freies DHEA: R= -H

Sulfat: R= -SO₃⁻

Sulfatid: R= $\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{-O-CO-R}_1 \\ | \\ \text{CH-O-CO-R}_2 \\ | \\ \text{-SO}_3\text{-CH}_2 \end{array}$

Glucuronosid: R= -CH₂-(CHOH)₄-COO⁻

Abb. 8 DHEA und seine Konjugate (Formelschema)

jugierten DHEA-s rechtfertigen (36). Der Metabolismus der DHEA-Sulfokonjugate entspricht in qualitativer Hinsicht demjenigen des freien Steroids oder des DHEA-glucuronosids, d.h. es treten dieselben Stoffwechselprodukte auf (11,35,65). Auch die Bildung von Androgenen und Östrogenen (Abb. 9) aus sulfokonjugiertem DHEA ist experimentell gesichert (10,52,63,80).

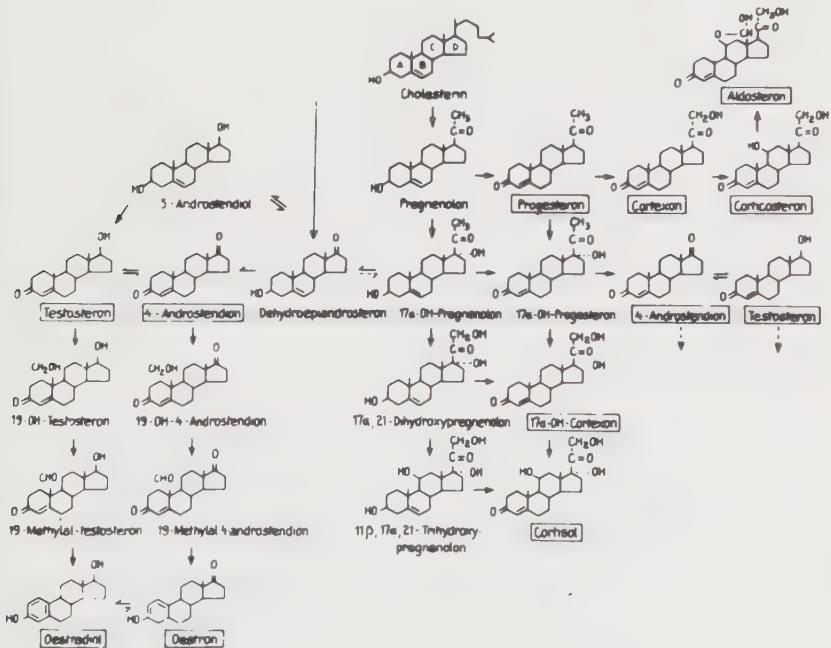


Abb. 9 Metabolismus von DHEA

Die geringe androgene Wirkung freien DHEA's geht sicher auf eine partielle Umwandlung in Androstendion zurück (96). Ein DHEA-Mangel soll den Vorstellungen von SONKA und anderen (87) gemäß als gemeinsamer pathogenetischer Faktor unter anderem Fettsucht bewirken, sowie einen mäßigen, auf Insulin schlecht ansprechenden Diabetes mellitus, vorzeitige Arteriosklerose, Tendenzen zu Thrombose, Gicht und manchen Formen der Hypertension, Krankheiten also, die sehr oft in verschiedenen Kombinationen auftreten (87). Die bei diesen Krankheiten beobachteten Stoffwechselveränderungen werden aufgrund eines durch den DHEA-Mangel aktivierten PPC erklärt. Schon viele Autoren (44,46,47,58) konnten eine Hemmung der G-6-PDH, des Schlüsselenzyms für den PPC, durch freies wie auch durch sulfokonjugiertes (48,49,50,56, 58,62,67,68,71) DHEA feststellen.

Zusammenfassend kann man sagen, daß das DHEA, welches im menschlichen Organismus vorwiegend als lipophiles Sulfatid vorzuliegen scheint, eine zweifache physiologische Aufgabe erfüllt: einmal die einer potentiellen Vorstufe der im Organismus benötigten Androgene und Östrogene, zum anderen möglicherweise die eines Regulators der G-6-PDH (59).

1.3. Glucoso-6-phosphat-dehydrogenase (Glucoso-6-PDH
Schlüsselenzym zum Pentosephosphat-Cyklus (PPC)

Der größte Teil der im menschlichen Organismus anfallenden Glucose wird auf dem glykolytischen Wege abgebaut, nach seinen wichtigsten Autoren auch "EMBDEN-MEYERHOF-PARNAS-Schema" genannt (Abb. 11). G-6-P entsteht beim Glykogenabbau und durch Phosphorylierung der Glucose, die unter dem Einfluß des Insulins aus dem Blutplasma in die Zelle einströmt (39). Dieser Substanz kommt im ganzen Kohlenhydratstoffwechsel eine zentrale Rolle zu. Selbst unter Vernachlässigung spezieller Wege, die zu Galactose und Lactose bzw. zum Glucuronat führen, ergeben sich vier Hauptwege, deren Verteilung (Abb. 10) je nach Funktionszustand des Gewebes unterschiedlich ist (76). Außer der Glykolyse besitzt für den Glucoseabbau nur die Oxydation des G-6-P's an C₁ eine Bedeutung. Hierbei wird durch die G-6-PDH Wasserstoff auf NADP übertragen und 6-Phosphogluconolacton gebildet. Diese Reaktion wurde schon 1931 von WARBURG entdeckt und das Enzym damals "Zwischenferment" genannt; ein Name, der heute nur noch historische Bedeutung hat (32). 6-Phosphogluconolacton wird seinerseits unter erneuter NADPH-Bildung oxydiert und weiter zu Pentosen decarboxyliert. So entstehen aus Glucose Pentosen, die für die Nucleinsäuresynthese notwendig sind. Den entsprechenden Stoff-

wechselweg bezeichnet man daher auch als Pentosephosphat-Cyklus (Abb. 11). Sein erstes und zugleich "rate limiting" Enzym ist die G-6-PDH, die sich in fast allen tierischen Geweben nachweisen läßt (40). Die Bedeutung des PPC liegt unter anderem in der Bildung von NADPH, der reduzierten Form des Nikotinamadenindinucleotidphosphats. Das NADPH stellt einen unentbehrlichen Wasserstoffdonator für zahlreiche reduktive Biosynthesen dar (87). Es beeinflußt so über die Neubildung von Cholesterin und weiter über das Pregnenolon die Steroidsynthese, die Bildung von Fettsäuren im Lynen-Cyklus, sowie die Synthese von Purinen

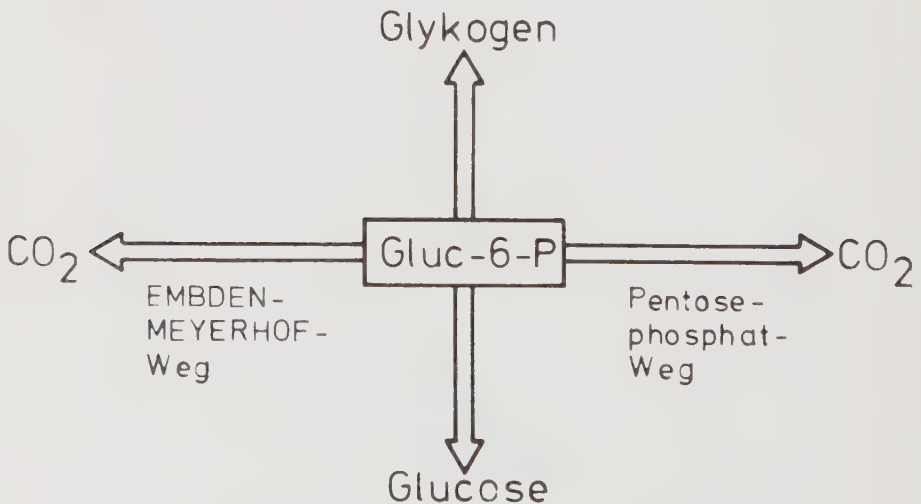


Abb. 10 Schaltstelle Glucose-6-Phosphat

und Pyrimidinen über die Bildung der Tetrahydrofolsäure. Durch NADPH werden weiterhin funktionelle SH-Gruppen, z.B. von Enzymen, in reduziertem Zustand erhalten. Andererseits kann aber auch ein Überschuß von NADPH die

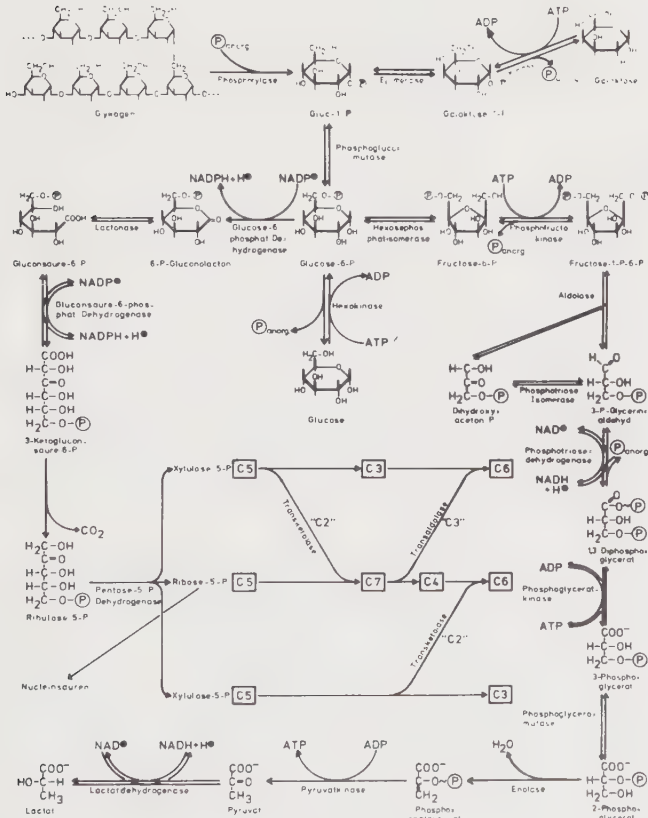


Abb. 11 Glucoseabbau durch Glykolyse bzw. über den Pentosephosphat-Cyklus (Stoffwechselschema)

Spaltung disulfidischer Bindungen, wie sie z.B. beim Insulin und bei den gamma-Globulinen vorliegen, bewirken, was dann zu einer Beeinträchtigung ihrer Funktion führt (45). Zu den wichtigsten Regulatoren der G-6-PDH gehören u.a. die Steroide DHEA und Pregnenolon, die als Inhibitoren des Enzyms bekannt sind (6,44,46,47,68,71).

II. PROBLEMSTELLUNG

Nach den bisherigen Ausführungen scheint gesichert zu sein, daß unter physiologischen Bedingungen eine wechselseitige Beziehung zwischen der Aktivität der G-6-PDH in Erythrocyten und dem Spiegel des DHEA's in Urin oder Plasma besteht (42,86,11,69). Nachdem DHEA-sulfat sich als inaktiv im G-6-PDH-Hemmtest erwies (92,71), wurde angenommen, daß die endogenen Sulfokonjugate des DHEA's, die im peripheren Plasma vorherrschen und offensichtlich an der Regulation dieses Enzyms teilnehmen, mit DHEA-sulfat nicht identisch sind. Vielmehr ist die endogene Hemmung des Enzyms offensichtlich auf das lipophile DHEA-sulfatid, als Steroidester einer Diglyceridschwefelsäure zurückzuführen (55,58,66).

Um weitere Informationen über den Mechanismus der G-6-PDH-Hemmung in menschlichen Erythrocyten durch DHEA oder seine Verbindungen zu gewinnen, wurde die Penetration der Erythrocyten durch freies Steroid, seine Sulfokonjugate oder Derivate untersucht.

III. MATERIAL UND METHODIK

3.1. Verwendete Abkürzungen

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ATP	Adenosintriphosphorsäure
DHEA	Dehydroepiandrosteron
-L-S	-laurylsulfat
-S	-sulfat
-P-SUL	-palmitoylsulfat
-STD	-sulfatid
DNPH	2,4-Dinitrophenylhydrazin
G-6-P	Glucose-6-Phosphat
G-6-PDH	Glucose-6-phosphat-dehydrogenase
M	Molar (Mol/Liter)
NADP	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
NADPH	Reduzierte Form von NADP
nm	Nanometer (= 10^{-9} Meter)
PPC	Pentosephosphat-Cyklus

3.2. Trivialnamen und chemische Bezeichnung der in dieser Arbeit vorkommenden Steroide

Ätiocholanolon	3 α -Hydroxy-5 β -androstan-17-on
Androsteron	3 α -Hydroxy-5 α -androstan-17-on

Androstendiol	5-Androsten-3 β ,17 β -diol
Androstentriol	5-Androsten-3 β ,16 α ,17 β -triol
Androstendion	4-Androsten-3,17-dion
DHEA	3 β -Hydroxy-5-androsten-17-on
16-OH-DHEA	3 β -16 α -Dihydroxy-5-androsten-17-on

3.3. Herkunft der Materialien

7 α -³H-DHEA und Ammonium-7 α -³H-DHEA-sulfat, die in dieser Untersuchung verwendet wurden, erhielten wir von der Firma New England Nuclear Corp., Boston, Mass. Die Reinheit wurde durch Papier und Dünnschichtchromatographie getestet. 7 α -³H-DHEA-sulfatid wurde wie bereits früher beschrieben hergestellt, während man die verschiedenen DHEA-ester aus 7 α -³H-DHEA und den jeweiligen Acylchloriden in Pyridin herstellte und durch Rekristallisation sowie präparative Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel G in Cyclohexaethyl-Acetat (4:1; v/v) reinigte.

3.4. Gewinnung der Erythrocyten

In der ersten Versuchsreihe wurden 10 ml Vollblut mit 2,5 ml Citratlösung (1,32 g Natrium-Citrat, 0,44 g Citronensäure und 1,47 g Dextrose in 100 ml Aqua bidest.) verdünnt und für 10 Minuten bei 1 500 g zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes wurde der Niederschlag

mit den Erythrocyten 3 mal mit je 25 ml 0,9 %iger Natriumchloridlösung gewaschen und danach in 10 ml 0,9 %iger Natriumchloridlösung mit 0,025 % EDTA suspendiert.

3.5. Inkubationsverfahren

Zu 1,0 ml dieser Lösung wurden 0,02 ml Dioxan mit 7α -³H-DHEA-sulfat oder 7α -³H-DHEA-sulfatid hinzugegeben. Die Endkonzentration des Steroides oder des Steroidkonjugates entsprachen einer 10^{-5} M-Lösung. Wenn der Einfluß von Lipiden untersucht werden sollte, wurden 0,01 ml Dioxan für die Zugabe des Steroids oder Steroidkonjugates benutzt und 0,01 ml Dioxan mit soviel Lecithin, Cholesterol-stearat oder Plasma-Lipiden, daß man eine 10^{-5} M molare oder physiologische Lösung der Additive erreichte. Nach 30 Minuten Inkubation bei 37 °C wurde die Suspension für 10 Minuten bei 1 500 g zentrifugiert, der Überstand abgegossen und der Rest zweimal mit 10 ml 0,9 %iger Natriumchloridlösung gewaschen. Die abgetrennten Erythrocyten wurden mit 3,0 ml Eiswasser hämolysiert und für 10 Minuten bei 5 000 g zentrifugiert. Der Rest mit den Membranen wurde zweimal mit 5 ml Aqua bidest. gewaschen und die Waschlösung zu dem Überstand mit dem Zellinhalt gegeben.

In der zweiten Versuchsreihe wurden 0,02 ml Dioxan mit 7α - ^3H -DHEA, seinen Sulfokonjugaten oder Derivaten zu 3,0 ml Citratblut gegeben. Die Endkonzentration des Steroids oder Steroidderivats entsprach einer 10^{-4} M-Lösung. Nach 30 Minuten bei 37°C wurden die Erythrocyten durch zehnminütige Zentrifugation bei 1 500 g abgetrennt und dreimal mit 10 ml 0,9 %iger Natriumchloridlösung gewaschen. Die Hämolyse wurde mit 5,0 ml Eiswasser durchgeführt. Zellmembranen wurden durch Zentrifugation über 20 Minuten bei 5 000 g und sorgfältiges Waschen erhalten. Zur Abschätzung der G-6-PDH-Aktivität im Überstand wurden 0,2 ml Hämolysat mit 2,8 ml 0,05 M-triethanolamin/0,005 M EDTA-Puffer von pH 7,6, 0,1 ml 0,01 M NADP und 0,05 ml 0,031 M G-6-P versetzt. Aus der Veränderung der Absorption bei 366 nm während 10 Minuten bei 25°C wurde die Enzymaktivität in der Probe bestimmt. Der Rest des Überstandes wurde auf ^3H -markierte Verbindungen untersucht. Es wurde die Biochemica-Test-Combination der Fa. Boehringer Mannheim GmbH verwendet. Zur Messung der G-6-PDH benutzte man die Gesamtmenge des Hämolysats und die Hemmung der Enzymaktivität wurde in Prozent der G-6-PDH-Aktivität im Hämolysat ohne Steroide ausgedrückt.

3.6. Extraktion der freien Steroide und Steroidkonjugate (70)

Zur Probe gab man unter ständigem Schütteln 4 Vol. Aceton,

ließ 60 Minuten bei 37 °C stehen und saugte vom ausgefällten Eiweiß ab. Das Filtrat wurde mit 8 Vol Diisopropylaether und 2 Vol Butanol-(2)- bezogen auf das Ausgangsvolumen der Probe - verdünnt, sowie mit genügend wasserfreiem Natriumsulfat versetzt und nach weiteren 60 Minuten bei 37 °C erneut filtriert. Man wusch den Rückstand mit Diisopropylaether-Butanol-(2)-(4:1 v/v) und dampfte das entwässerte Filtrat schließlich im Rotationsverdampfer bei maximal 37 °C zur Trockne ein.

Säulenchromatographie an Polyamid

Der Rückstand wurde mittels wenig Cyclohexan-Diisopropylaether (1:1 v/v) quantitativ auf die im gleichen Lösungsmittelgemisch zubereitete Säule (0,75 x 7,5 cm für Extrakte aus 10 ml Plasma) aus Polyamid-SC-6 (Macherey, Nagel & Co, Düren) überführt. Die Elution der Säule erfolgte mit 50 ml Cyclohexan-Diisopropylaether (1:1 v/v), 25 ml Diisopropylaether-Methanol (1:1 v/v), 25 ml Methanol und 25 ml Methanol-Salzsäure (99:1 v/v). In den beiden ersten Eluatzen befinden sich die lipophilen Steroidsulfatide, in der letzten die Steroidsulfate und Steroid-glucuronoside. 1/10 der einzelnen Fraktionen wurde für die Radioaktivitätsbestimmung benützt, der Rest wie folgt weiter verarbeitet.

3.7. Dünnschichtchromatographie der C₁₉-Steroide auf Kieselgel-G

a. Freie Steroide

Der in wenig Chloroform gelöste Trockenrückstand der freien Steroide wurde strichförmig auf eine 0,25 mm dicke Dünnschicht aus aktiviertem Kieselgel G überführt, daneben eine sichtbare Menge entsprechenden Standards (DHEA, Adion, Adiol und Atriol). Die Entwicklung des Chromatogramms geschah im Lösungsmittelsystem Chloroform-Dioxan (94:6 v/v). Die dem jeweiligen Standard entsprechende Zone wurde mit Chloroform-Methanol (1:1 v/v) eluiert (61) und zur vollkommenen Trockne gebracht.

b. Solvolyse der Steroidkonjugate

Der Trockenrückstand wurde mit 30 ml Perchlorsäureaether (1:100 v/v) aufgenommen und die Lösung 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Aetherphase mit Wasser gewaschen und die phenolischen Steroide mit 20 ml 1 N-NaOH entfernt. Die Aetherlösung mit den neutralen Steroiden wurde mit Wasser neutral gewaschen und zur Trockne gebracht. Die weitere Verarbeitung erfolgte wie bei den freien Steroiden beschrieben.

Farbreaktion mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH)
(91,89,90)

Der Rückstand der 17-Ketosteroide wurde mit 0,1 ml DNPH in Aethylacetat bei 37 °C zur völligen Trockene eingedampft. Danach versetzte man die Proben mit 1,0 ml 0,02 %iger Trichloressigsäure in absolutem Benzol, inkubierte 30 Minuten bei 37 °C und dampfte zur Trockene ein.

Der in wenig Chloroform gelöste Trockenrückstand wurde strichförmig auf eine 0,25 mm dicke Dünnschicht aus aktiviertem Kieselgel G überführt, daneben eine sichtbare Menge der DNPH-Derivate von DHEA, 16-OH-DHEA, Andro, Ätio und Testo. Die Entwicklung des Chromatogramms geschah in dem Lösungsmittelsystem Chloroform-Dioxan (94:6 v/v). Die dem Standard entsprechenden Zonen wurden mit Methylenchlorid-Methanol (9:1 v/v) eluiert (61) und zur vollkommenen Trockene eingedampft.

3.8. Bestimmung der Glucose-6-phosphat-dehydrogenase (40)

Das Prinzip basiert im wesentlichen auf dem optischen Test nach WARBURG. Das Enzym G-6-PDH katalysiert die wasserstoffübertragende Reaktion.

$G-6-P + NADP^+ \longrightarrow \text{Gluconat-6-P} + NADPH + H^+$, deren

Gleichgewicht weit auf der Seite von 6-Phosphogluconat und NADPH liegt. Man bestimmt die Aktivität der G-6-PDH aus der Geschwindigkeit der durch diese Reaktion hervorgerufenen NADPH-Zunahme. NADPH ist Meßgröße und aufgrund seiner Absorption bei 366, 340 oder 334 nm leicht zu bestimmen. Die im folgenden beschriebene Methode lehnt sich an die Angaben von KORNBERG und HORECKER an (37).

3.9. Messung der Radioaktivität

Die Tritiumaktivität wurde im Packard Tricarb Spektrometer (Modell 3320) gemessen, wobei man jede Probe durch externe Standardisierung auf Löscheffekte untersuchte.

IV. ERGEBNISSE

Im Anschluß an die Inkubation gewaschener menschlicher Erythrocyten mit 10^{-5} M-Konzentration von 7α - 3 H-DHEA, 7α - 3 H-DHEA-sulfat oder synthetischem 7α - 3 H-DHEA-sulfatid, gegebenenfalls in Gegenwart verschiedener Lipide, konnten in den Fraktionen der Zellmembranen und des Zellinhaltes, die in Tabelle 1 wiedergegebenen Werte gefunden werden.

Die Konzentration der Lipide entspricht einer 10^{-5} M Lösung oder 1 ml Plasma.

Substrat	Dazu gegeben	Original 3 H-Aktivität, %	
		Ery-Inhalt	Ery-Membranen
7α - 3 H-DHEA	-	11,9	0,28
7α - 3 H-DHEA-S	-	1,9	0,78
7α - 3 H-DHEA-S	Lecithin	2,0	0,84
7α - 3 H-DHEA-S	Cholesterol-Stear.	2,9	0,90
7α - 3 H-DHEA-S	Plasma-Lipiden	2,1	0,74
7α - 3 H-DHEA-STD	-	30,1	2,56
7α - 3 H-DHEA-STD	Lecithin	28,4	2,78
7α - 3 H-DHEA-STD	Cholesterol-Stear.	29,2	2,40
7α - 3 H-DHEA-STD	Plasma-Lipiden	30,5	2,50

Tab. 1 3 H-Aktivität im Hämolysat der intakten Erythrocyten nach der Bebrütung mit 7α - 3 H-DHEA und seinen Sulfokongjugaten (10^{-5} M).

Ähnliche Ergebnisse wurden nach der Inkubation von Citratblut mit 10^{-4} M-Konzentrationen von 7α - 3 H-DHEA und seinen Sulfokonjugaten oder Derivaten erhalten, wie aus Tabelle 2 ersichtlich ist. Diese Tabelle enthält ebenfalls Informationen über die Hemmung der erythrocytären G-6-PDH, verursacht durch die eingedrungenen 3 H-markierten Verbindungen.

Substrat	3 H-Aktivität im Hämolysat, %	Hemmung der G-6-PDH Enzymaktivität, %
7α - 3 H-DHEA	7,2	4
7α - 3 H-DHEA-sulfat	2,0	0
7α - 3 H-DHEA-sulfatid	25,6	38
7α - 3 H-DHEA-acetat	10,3	3
7α - 3 H-DHEA-caproat	12,4	0
7α - 3 H-DHEA-laurat	15,9	0
7α - 3 H-DHEA-stearat	18,7	0

Tab. 2 Hemmung der G-6-PDH in Erythrocyten nach der Bebrütung des Citratblutes mit 7α - 3 H-DHEA und seinen Sulfokonjugaten oder Derivaten (10^{-4}).

Die Tabelle 3 zeigt schließlich die aus DHEA bzw. seinen Konjugaten entstandenen Metaboliten, die im Verlauf der Inkubation gebildet worden waren.

Substrat 10 ⁻³	DHEA %	Adiol %	Atriol %	16-OH- %	Andro %	Ätio + Testo %
DHEA 362250	16 100 5,0	2 570 0,71	398 0,11	3 258 0,9	1 440 0,4	145 0,04
DHEA 362250	21 000 5,8	2 170 0,60	434 0,12	3 980 1,1	3 260 0,9	253 0,07
D-L-S 116215	20 760 17,9	742 0,64	420 0,35	1 500 1,3	580 0,5	281 0,24
D-L-S 116215	17 980 15,5	670 0,58	430 0,37	2 570 2,2	691 0,6	350 0,70
D-P-SUL 155663	17 300 11,1	499 0,32	174 0,11	1 872 1,2	945 0,6	110 0,07
D-P-SUL 155663	14 976 9,6	530 0,34	283 0,18	2 190 1,4	1 250 0,8	185 0,12
D-STD 82290	23 000 27,7	913 1,10	435 0,52	2 240 2,7	1 741 2,1	
D-STD 82290	18 820 22,7	815 0,98	520 0,63	282 3,4	160 1,9	191 0,23

Tab. 3 Stoffwechsel des DHEA's und seiner Konjugate
bzw. Derivate in den menschlichen Erythrocyten.

Der Anteil der einzelnen Steroide, die man aus dem Hämolysat extrahierte, bezieht sich dabei auf die gesamte, zu den Erythrocyten zugegebene Radioaktivität der verschiedenen Verbindungen. Im Hämolysat traten hier- nach außer DHEA vor allem 16-OH-DHEA, Adiol, Androsteron und Atriol auf.

Die Konzentrationen des Äthiocholanolons und Testosterons lagen demgegenüber wesentlich niedriger. Beide Steroide wurden in Tabelle 3 gemeinsam aufgeführt, da eine Iso- lierung der Einzelverbindungen die eindeutige Zuordnung gefundener Impulsraten durch Reinigung bis zur konstanten spezifischen Aktivität aufgrund unzureichender ^3H -Aktivität nicht zugelassen hatte.

V. DISKUSSION

Anhand der Ergebnisse, die in Tabelle 1 dargestellt sind, läßt sich feststellen, daß bei einer Konzentration von 10^{-5} M wesentliche Mengen sowohl an freiem DHEA als auch an synthetischem DHEA-sulfatid während einer 30-minütigen Inkubation in die gewaschenen Erythrocyten eingedrungen waren. Als die Erythrocyten mit äquimolaren Konzentrationen von DHEA-sulfat inkubiert wurden, konnten nur 2,7 % der ursprünglichen ^3H -Aktivität im Hämolysat aufgefunden werden, wovon 1,9 % im Zellinhalt und 0,8 % in den Zellmembranen auftraten. Die Zugabe von Lipiden zu Inkubaten mit DHEA-sulfat konnte die Diffusionsrate dieses Konjugates nicht erhöhen, obwohl ein leichter Effekt bei Cholesterinstearat beobachtet wurde. Offensichtlich kann die Formation eines heteropolaren Komplexes zwischen dem anionischen Steroidsulfat und der quaternären Ammoniumgruppe des Lecithins (12) die Durchdringung der Zellmembran nicht beschleunigen. Auch die Diffusion von lipophilem DHEA-sulfatid in die Erythrocyten, wurde durch Zugabe äquimolarer Mengen von Lipiden nicht signifikant verändert.

Daß die Diffusion von DHEA, seinen Sulfokonjugaten oder Derivaten hauptsächlich von den lipophilen Eigenschaften der einzelnen Verbindungen abhängt, kann aus den Ergebnissen

abgeleitet werden, die in Tabelle 2 zu finden sind. Hier wird nicht nur der Prozentsatz von ^3H -markierten Verbindungen aufgezeigt, der in die Erythrocyten während der Inkubation diffundiert ist, sondern auch die prozentuale Hemmung der G-6-PDH. Unter Bezug auf die Diffusion der verschiedenen Verbindungen in die Erythrocyten scheint von Interesse, daß bei einer Konzentration von 10^{-4} wesentlich größere Mengen an ^3H -markierten Verbindungen in den Hämolysaten der gewaschenen Erythrocyten entdeckt werden konnte, als bei einer Konzentration von 10^{-5} M. Offensichtlich ist die maximale Penetrationsrate der verschiedenen Verbindungen bereits bei Verwendung einer 10^{-5} M-Lösung noch nicht erreicht, was auf eine große Kapazität der Erythrocyten für diese Substanzen hindeutet. Als Konsequenz zeigte sich, daß die Hemmung der G-6-PDH-Aktivität in den Hämolysaten durch Erhöhung der Konzentration eines potentiellen Inhibitors gesteigert wurde. Da eine umgekehrte Korrelation zwischen der Hemmung der G-6-PDH-Aktivität und der Kettenlänge von Fettsäureestern des DHEA's zu bestehen scheint, hängt also die biologische Aktivität dieser Verbindungen von ihrer Struktur und nicht von ihrer Lipophilität ab. Gleichzeitig unterstützen diese Ergebnisse die Hypothese, daß das endogene DHEA-sulfatid an der Regulation der G-6-PDH-Aktivität in menschlichen Erythrocyten teilnimmt. Unter Bezug auf die Tatsache, daß nach der Inkubation von Citratblut mit DHEA oder DHEA-

sulfatid eine deutliche Hemmung des Enzyms beobachtet werden konnte, scheint das Fehlen einer solchen Hemmung bei placentarer G-6-PDH durch diese Verbindungen in Gegenwart von Albumin (5) nun durch die Adsorption des gereinigten Enzyms an Plasmaproteine erklärlich.

Die Angaben in Tabelle 3 zeigen die prozentuale Umwandlung von DHEA in wesentliche Metaboliten. In den Proben, welche DHEA-sulfatid als Substrat enthielten, fand man in der DHEA-Fraktion des Hämolysats 27,7 % bzw. 22,7 %. Bei der Bebrütung mit freiem DHEA wurden 5,0 % bzw. 5,8 % der ursprünglichen Radioaktivität als DHEA festgestellt. Synthetische lipophile Steroidkonjugate wie DHEA-laurylsulfat und DHEA-palmitoylsulfonat, lagen in ihrer Penetrationsrate zwischen freiem DHEA und DHEA-sulfatid. Bei DHEA-laurylsulfat entdeckte man in der DHEA-Fraktion des Hämolysats 17,9 % bzw. 15,5 % ursprünglicher Radioaktivität, bei DHEA-palmitoylsulfat 11,1 % bzw. 9,6 %. Die Konzentration an 17-Oxosteroid aber ist sicher für die Hemmwirkung verantwortlich.

DHEA und seine lipophilen Konjugate erfüllen nicht nur die Funktion eines Inhibitors der G-6-PDH, sondern sind in den Erythrocyten gleichzeitig ein Substrat für verschiedene Steroid-umwandelnde Enzyme. So geht aus Tabelle 3 hervor, daß in den Erythrocyten 17- β -Oxydoreduktase enthalten ist. Das Produkt dieser enzymatischen Reaktion: ADIOL, wurde in

allen Proben gefunden. Andererseits konnte die 3 β -Hydroxysteroid-dehydrogenase nicht nachgewiesen werden, die DHEA in ADION umwandelt. In den Proben, welche mit dem DHEA-sulfatid bebrütet worden waren, stellte man wesentlich mehr ANDROSTERON fest, als in den mit DHEA versetzten Proben. Gleiches gilt für 16-OH-DHEA, welches in den mit DHEA-sulfatid inkubierten Proben 3 mal höher war, als bei den Proben mit freiem DHEA als Substrat. Weniger Radioaktivität war in den Fraktionen von ATRIO und ÄTHIO + TESTO nachgewiesen, doch zeigte sich die gleiche Tendenz wie bei der Bildung von Androsteron und 16-OH-DHEA. Was die Affinität des DHEA's und seiner lipophilen Konjugate für die Steroid-umwandelnden Enzyme betrifft, so wurden in dieser Arbeit auf kinetische Daten verzichtet, wenngleich die Resultate in Tabelle 3 auf unterschiedliche K_M -Werte hindeuten.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Durch Inkubation intakter gewaschener, menschlicher Erythrocyten mit 7α - 3 H-DHEA, 7α - 3 H-DHEA-sulfat oder synthetischem 7α - 3 H-DHEA-sulfatid konnte gezeigt werden, daß nur das lipophile DHEA und DHEA-sulfatid in der Lage sind, in meßbaren Mengen in die Erythrocyten einzudringen. Die Zugabe von Lipiden zu solchen Inkubaten mit DHEA-sulfat oder DHEA-sulfatid führte zu keiner wesentlichen Veränderung ihrer Diffusion in die Zellen. Die Inkubationen von Citratblut und 7α - 3 H-DHEA, sowie verschiedenen Sulfokonjugaten oder Fettsäureestern ließ eine beachtliche Diffusion letzterer Derivate in die Erythrocyten erkennen, ohne daß diese Verbindungen jedoch eine wesentliche Hemmung der erythrocytären G-6-PDH hätten. Hieraus ergibt sich, daß nur die Penetration der Zellmembran vom lipophilen Charakter der einzelnen Verbindungen abhängt, ihr Effekt auf die G-6-PDH aber durch die chemische Struktur bedingt wird.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

1. BAGGETT, B.,
ENGEL, L.L.,
SAVARD, K.,
DORFMANN, R.J.: Conversion of testosterone-3-C₁₄
to C₁₄-estradiol-17- β by human
ovarian tissue.
J. biol. Chem. 221 (1956), 931-941
2. BAULIEU, E.E.: Three sulfat esters of 17-keto-
steroids in the plasma of normal
subjects and after administration
of ACTH.
J. clin. Endocr. 20 (1960), 900-904
3. BAULIEU, E.E.: Studies of conjugated 17-keto-
steroids in a case of adrenal
tumor.
J. clin. Endocr. Metab. (Springfield)
22, (1962) 501-510
4. BAULIEU, E.E.,
CORPECHOT, C.,
DRAY, F.: An adrenal-secreted "androgen"
Dehydroisoandrosteronesulfat; its
metabolism and a tentative generali-
sation on the metabolism of the
steroid conjugates in man.
Recent Progr. Hormone Res. 21
(1965), 411-500
5. BENES, P.,
OERTEL, G.W.: Effects of dehydroepiandrosterone,
its conjugates or derivatives upon
the activity of human placental
glucose-6-phosphate dehydrogenase
J. Steroid Biochem. (in press 1971)

6. BETZ, C.,
WARREN, J.C.:
Studies with glucose-6-phosphate dehydrogenase from human placenta.
Acta endocr., 49, (1965) 47-49
7. BISHOP, CH.:
The red blood cell.
Acad. press, New York 1961
8. BLOCH, E.,
BENIRSCHKE, K.:
Synthesis in vitro of steroids by human fetal adrenal gland slices.
J. biol. Chem. 234 (1959) 1085-1089
9. BLOCH, E.,
DORFMANN, R.J.,
PINCUS, G.:
The Conversion of Acetate to Dehydroepiandrosterone by Human Adrenal Gland Slices.
Arch. Biochem. 61 (1956) 245-247
10. BOLTE, E.,
MANCUSO, S.,
ERIKSON, C.:
Studies on the aromatisation of neutral steroids in pregnant women.
I. Aromatisation of C₁₉-steroids by placentas perfused insitu.
Acta endocr. (K'hvn), 45 (1964) 535-559
11. BRANDAU, H.,
LUK, W.:
Der Einfluß von Steroidhormonen auf die Glucoseoxidation.
Geburtsh. und Frauenheilk. 28 (1968) 1074-1075
12. BURSTEIN, S.:
Interaction of (7 α -³H)-androsteno-
ne sulfate with cationic detergents and phosphatides.
Biochim. biophys. Acta 62 (1962) 576-578

13. BURSTEIN, S.,
DORFMANN, R.J.: Biosynthesis of C₁₉-steroids from 4-14-C-cholesterol and 7-³H-pregnenolone in vivo: consideration of new pathways.
Acta endocr. 40 (1962) 188-202
14. CALLOW, N.H.,
CALLOW, R.K.: Isolation of 17-ketosteroids from urine of normal women.
Biochem. J. 33 (1939), 931-934
15. CLAYTON, G.W.,
BONGIOVANNI, A.M.,
PAPADATOS, C.: Preliminary investigations into nature of neutral 17-ketosteroids in human plasma.
J. clin. endocr. 15 (1955), 693-701
16. COHN, G.L.,
MULROW, P.J.: Androgen release and synthesis in vitro by human adult adrenal glands.
J. clin. Invest. 42 (1963), 64-78
17. CORPEchOT, C.,
BAULIEU, E.E.: Formation de sulfate d'androsta-5-ene-3- β ,16- α ,17- β -triol-358-³H apres administration de sulfate de 3- β -hydroxyandrosta-5-ene-17-one (sulfat de dehydroepiandrosterone)-35S-³H. Signification de ce "metabolisme ulterieur d'un steroide conjugue pour la biosynthese de l'oestriol par le placenta".
C.R. Acad. Sci. (Paris) 258 (1964) 3584-3586
18. DORFMANN, R.J.: Biochemistry of the steroid hormones.
Ann. Rev. Biochem. 26 (1957), 523-560

19. DORFMANN, R.J., Metabolism of Steroid Hormones
 UNGAR, F.: New York 1965
20. ENGEL, L.L., Urinary excretion of steroid
 THORN, G.W., compounds; normal male subjects.
 LEWIS, R.A.: J. biol. Chem. 137 (1941), 205-215
21. FONKEN, G.S., Pathway of Progesterone Oxidation
 MURRAY, H.C., by Cladosporium Resinae.
 REINECKE, L.M.: J. Amer. chem. Soc. 82 (1960),
 5507-5508
22. FRANCIS, F.E., Enteric excretion of metabolites
 SHEN, N.-H.C., of steroid hormones in the human;
 KINSELLA, R.A. Jr.: II. Isolation of 5-androstene-3 β -ol-
 17-one from meconium.
 J. biol. Chem. 235 (1960) 1957-1959
23. FRIES, N., Entero-hepatischer Kreislauf von
 KNAPSTEIN, P., C₁₉-Steroiden. V. Resorption und
 WENDLBERGER, F., Rekonjugation von 7 α -³H-DHEA-³⁵S-
 OERTEL, G.W.: Sulfat im Dünndarm des Menschen
 in vivo.
 Acta endocr. (K'hvn) 56 (1967)
 705-712
24. GOLDSTEIN, M., Conversion of pregnenolone to de-
 GUT, M., hydroepiandrosterone.
 DORFMANN, R.J.: Biochem. biophys. Acta (Amst.) 38
 (1960), 190-191
25. GREENBLATT, R.V.: STEIN-Leventhal-Syndrome.
 J. Amer. med. Ass. 195 (1966), 53

26. GUAL, C.,
MORATO, T.,
HAYANO, M.: Biosynthesis of estrogens.
Endocr. 71 (1962) 920-925
27. GUAL, C.,
SANCHEZ, Z.,
DORFMANN, R.J.,
ROSENTHAL, J.M.: Androgen biosynthesis in an inter-
stitial cell tumor of the testis.
J. clin. Endocr. 22 (1962), 1040-
1042
28. HARRIS, J.W.: The Red Cell.
Harward univ. press. Cambridge
Mass. 1963
29. HEARD, R.D.H.,
JELLINCK, P.H.,
O'DONNELL: Biosynthesis of estrogens: conver-
sion of testosterone-4-C₁₄ to
estrone in pregnant mare.
Endocr. 57 (1955), 200-204
30. HIRSCHMANN, H.: Steroids of urine of ovariectomized
women.
J. biol. Chem. 136 (1940), 483-502
31. KAHNT, F.W.,
NEHER, H.,
SCHMIDT, K.,
WETTSTEIN, A.: Formation of 17 -hydroxy- 5-preg-
nenolone and 3 β -hydroxy-17-keto-
 Δ 5-androstene (DHEA) in adrenal and
testicular tissue.
Experientia (Basel) 17 (1961),
19-21
32. KARLSON, P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie.
7. Aufl. Stuttgart 1969

33. KASE, N.,
FORCHIELLI, E.,
DORFMANN, R.J.: In vitro production of testosterone
and androst.-4-ene-3,17-dione in
a human ovarian homogenate.
Acta endocr. 37 (1961), 19-23
34. KASE, N.,
FORCHIELLI, E.,
DORFMANN, R.J.: Unpublished data 1962 (zitiert
nach DORFMANN und UNGAR, F. (24)).
35. KNAPSTEIN, P.,
RINDT, W.,
WENDLBERGER, F.,
OERTEL, G.W.: Plasmahalbwertszeit, Exkretion und
direkter Metabolismus von 7α - ^3H -
Androstenolon- ^{14}C -glucuronid beim
Menschen.
Hoppe-Seyler's Zsch. physiol. Chem.
348 (1967), 93-99
36. KNAPSTEIN, P.,
WENDLBERGER, F.,
OERTEL, G.W.: Enteropatic circulation of 7α - ^3H -
DHEA- ^{35}S -sulfate, 7α - ^3H -DHEA- ^{14}C -
glucuronoside and free 7α - ^3H -DHEA
in the human.
Experientia (Basel) 23 (1967), 480
37. KORNBERG, A.,
HORECKER, B.L.: Methods in Enzymology.
Academic Press, New York 1955
38. KOWALSKI, E.,
NIEWIAROWSKI, S.: Biochemistry of Blood Plateles.
Acad. Press, London 1967
39. LEUTHARDT, F.: Lehrbuch der physiolog. Chemie
15. Aufl. Berlin 1963

40. LÖHR, G.W.,
WALLER, H.D.: Glucose-6-phosphat-dehydrogenase
(Zwischenferment).
In: Methoden der enzymatischen
Analyse hrsg. von BERGMEYER, H.U.
Weinheim 1962, S. 744-751
41. LONDON, I.M.: The Metabolism of the erythrocyte.

Harvey Lectures 56, Acad. Press
New York 1961
42. LOPEZ, S.A.,
KREHL, W.: A possible interrelation between
glucose-6 phosphate dehydrogenase
and dehydroepiandrosterone in
obesity.
Lancet ii: (1967), 485-487 ,
43. MAHESH, V.B.,
GREENBLATT, R.B.: Isolation of dehydroepiandrosterone
and 17 α -hydroxy- Δ 5-pregnenolone
from the polycystic ovaries of the
STEIN-LEVENTHAL-Syndrome.
J. clin. Endocr. 22 (1962), 441-448
44. MAC KERNS, K.W.,
KALEITH, E.: Inhibition of glucose-6-phosphate
dehydrogenase by hormones.
Biochem. biophys. Res. Comm. 2
(1960), 344-348
45. MALINA, L.,
SONKA, J.,
GREGOROVA, I.: Die Ausscheidung von DHEA im Urin
von Psoriasiskranken.
Derm. Wschr. 46 (1964), 503-508
46. MARKS, P.A.,
BANKS, J.: Erythrocyte glucose-6-phosphate de-
hydrogenase of normal and mutant
human subjects.
J. biol. Chem. 236 (1961), 10-17

47. MARKS, P.A.,
BANKS, J.:
Inhibition of Mammalian Glucose-6-phosphate dehydrogenase by Steroids.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 46
(1960), 442-452
48. MENZEL, P.,
GOBBERT, M.,
OERTEL, G.W.:
Effects of DHEA and its conjugates upon the activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase in human placenta.
Hormone Metab. Res. 2 (1970) 225-227
49. MENZEL, E.,
MENZEL, P.,
OERTEL, G.W.:
Hemmung der Glucose-6-phosphat-dehydrogenase in menschlichem Hirngewebe, VI. Einwirkung von Androstendion und seinen Konjugaten auf die Aktivität der Glucose-6-phosphat-dehydrogenase.
Hoppe-Seyler's Zschr. physiol. Chem. 351 (1970), 759-760
50. MENZEL, P.,
OERTEL, G.W.:
Inhibition of testicular glucose-6-phosphate-dehydrogenase by dehydroepiandrosterone and its conjugates.
Clin. chim. Acta (Amst.) 29 (1970) 195-196
51. MIGEON, C.J.,
PLAGER, J.E.:
Identification and isolation of dehydroisoandrosterone from peripheral human plasma.
J. biol. Chem. 209 (1954) 767-772

52. MORATO, T.,
LEMUS, A.E.,
GUAL, C.: Efficiency of dehydroepiandrosterone sulphate as an estrogen precursor (1).
Steroids, Suppl. 1, (1965) 59-74
53. NEHER, R.,
WETTSTEIN, A.: Occurrence of Δ^5 -3 β -hydroxy-steroids in adrenal and testicular tissue.
Acta endocr. 35 (1960), 1-7
54. NOALL, M.W.,
ALEXANDER, J.,
ALLEN, W.M.: Dehydroisoandrosterone-synthesis by the human ovary.
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 59 (1962), 520-521
55. OERTEL, G.W.: Über Steroidkonjugate in Plasma.
I. Isolierung von sulfat-, phosphat- und lipoidhaltigen 17-Ketosteroidkonjugaten aus menschlichem Blutplasma.
Biochem. Z. 334 (1961 a), 431-440
56. OERTEL, G.W.: Über Steroidkonjugate im Plasma.
II. Synthese von Sulfatidyl-Dehydroepiandrosteron.
Naturwissen. 48 (1961), 621
57. OERTEL, G.W.: Über Steroidkonjugate im Plasma.
XII. Plasmaspiegel verschiedener Steroidkonjugate in Nebennierenvenen-, Lebervenen- und Femoralvenen-Blut.
Hoppe-Seyler's Zschr. physiol. Chemie 336 (1964), 236-247

58. OERTEL, G.W.: Über Steroidkonjugate im Plasma.
XVII. Isolierung und Charakterisierung lipophiler Steroidkonjugate aus Nebennierenrindegewebe, Plasma und Liquor.
Hoppe-Seyler's Zschr. physiol. Chemie 343 (1966), 276-281
59. OERTEL, G.W.: Dehydroepiandrosteron in biochemischer und klinischer Sicht.
Arzneimittel-Forsch. (Aulendorf) im Druck
60. OERTEL, G.W., GROOT, K.: Über Steroidkonjugate im Plasma.
XIII. Isolierung, Eigenschaften und Zusammensetzung eines biosynthetischen, lipophilen DHEA-Konjugates.
Hoppe-Seyler's Zschr. physiol. Chem. 341 (1965), 1-9
61. OERTEL, G.W., GROOT, K.: Estimation of pregnandiol and pregnatriol in urine.
Clin. chem. Acta (Amst.) 11 (1965) 512-518
62. OERTEL, G.W., GROOT, K., BRÜHL, P.: Über Steroidkonjugate im Plasma.
XIV. Zur Bindung von sulfokonjugierten Steroiden an Plasmaproteine.
Hoppe-Seyler's Zschr. physiol. Chem. 341 (1965), 10-21
63. OERTEL, G.W., GROOT, K., WENZEL, D.: On lipophile steroid conjugates.
II. In vivo biogenesis of estrogens from biosynthetic dehydroepiandrosterone sulfatide.
Acta endocr. (K'hvn) 49 (1965), 533-540

64. OERTEL, G.W.,
KAISER, E.:
Determination of dehydroisoandrosterone, androsterone, etiocholanolone, and 11 β -hydroxy-etiocholanolone in human plasma.
Clin. chim. Acta 7 (1962), 221-225
65. OERTEL, G.W.,
KNAPSTEIN, P.,
TREIBER, L.:
Über Steroidkonjugate im Plasma.
XIX. Direkter und indirekter Metabolismus von i.v. verabreichten ³H und ³⁵S-markierten Androstenolonsulfats.
Hoppe-Seyler's Zschr. physiol. Chem. 345 (1966), 221-235
66. OERTEL, G.W.,
MENZEL, P.:
Inhibition of human glucose-6-phosphate-dehydrogenase activity by dehydroepiandrosterone sulfatide.
Excerpta Medica Int. Congr. Series 210 (1970), 163
67. OERTEL, G.W.,
MENZEL, P.,
BAUKE, D.:
Effects of dehydroepiandrosterone and its conjugates upon the activity of glucose-6-phosphate-dehydrogenase.
III. Inhibition of glucose-6-phosphate-dehydrogenase in human ovarian tissue.
Steroidologia 1 (1970), 2-7
68. OERTEL, G.W.,
MENZEL, P.,
BAUKE, D.:
Effect of dehydroepiandrosterone and its conjugates upon the activity of glucose-6-phosphate-dehydrogenase, II.
Clin. chim. Acta (Amst.) 27 (1970) 197-201

69. OERTEL, G.W.,
MENZEL, P.,
HOFFMANN, G.,
HOLZMANN, H.: Steroide und Haut. V. Dehydro-
epiandrosteron im Plasma und
Glucose-6-phosphat-dehydrogenase
in Erythrocyten von Psoriatikern
vor und nach Gabe von Dehydroepiandro-
steronsulfat.
Z. Klin. Chem. 9 (1971), 28-30
70. OERTEL, G.W.,
MENZEL, P.,
WENZEL, D.: Über Steroidkonjugate im Plasma,
XXI. Zur Isolierung von Steroid-
sulfatiden aus biologischem Material.
J. Steroid. Biochem. 1 (1969) 17-23
71. OERTEL, G.W.,
REBELEIN, I.: Effects of dehydroepiandrosterone
and its conjugates upon the
activity of glucose-6-phosphate-
dehydrogenase in human erythrocytes.
Biochem. biophys. Acta (Amst.)
184 (1969), 459-460
72. OKADA, M.,
FUKUSHIMA, D.K.,
GALLAGHER, T.F.: Isolation and characterisation of
3 β -hydroxy- Δ 5-steroids in adrenal
carcinoma.
J. biol. Chem. 234 (1959), 1688-1692
73. O'MALLEY, B.W.,
LIPSETT, M.B.,
JACKSON, M.A.: Steroid Content and Synthesis in a
Virilizing Luteoma.
J. clin. Endocr. 27 (1965), 311-319
74. PRANKERD, T.A.J.: The Red Cell.
Blackwell, Oxford (1961)

75. RAO, B.G.,
HERAD, R.D.H.: Biogenesis of the Corticosteroids.
II. Conversion of C_{14} -Progesterone
in Cellfree-Hog Adrenal-Preparations.
Arch. Biochem. 66 (1957), 504-506
76. RAPOPORT, S.M.: Medizinische Biochemie.
4. Aufl. Berlin 1966
77. ROBERTS, K.D.,
VAN DE WIELE, R.L.,
LIEBERMANN, S.: 17α -hydroxy-pregnenolone as a
precursor of urinary steroids in
a patient with virilizing adenoma
of the adrenal.
J. clin. Endocr. 21 (1961), 1522-1533
78. RYAN, K.J.: Biological aromatisation of steroids.
J. biol. Chem. 234 (1959), 268-272
79. SAVARD, K.,
DORFMANN, R.J.,
BAGGETT, B.,
ENGEL, L.L.: Biosynthesis of androgens from
progesterone by human testicular
tissue in vitro.
J. clin. Endocr. 12 (1956), 1629-1631
80. SIITERI, P.K.,
MAC DONALD, P.C.: Estrogen formation in human preg-
nancy.
J. clin. Endocr. Metab. (Springfield)
26 (1966), 751-761
81. SIMMER, H.,
SIMMER, J.,
ZELLMAR, O.: Androgens in the peripheral venous
blood of healthy pregnant women and
those with late gestoses.
Klin. Wschr. 37 (1959), 966-971
82. SIMMER, H.,
VOSS, H.E.: Androgens in the human placenta.
Klin. Wschr. 38 (1960), 819-822

83. SLAUNWHITE, W.R., Progesterone as precursor of
SAMUELS, L.T.: testicular androgens.
J. biol. Chem. 220 (1956), 341-352
84. SOLOMON, S., The conversion in vivo of 17 α -hydro-
CARTER, A.C., xy-pregnenolone to dehydroisandro-
LIEBERMANN, S.: sterone and other 17-keto-steroids.
J. biol. Chem. 235 (1960), 351-355
85. SOLOMON, S., The in vitro synthesis of 17 α -hydro-
VAN DE WIELE, R., xy-progesterone and 4-androstene-
LIEBERMANN, S.: 3,17-dione from progesterone by
 bovine ovarian tissues.
J. Amer. chem. Soc. 78 (1956),
5453-5454
86. SONKA, J., Dehydroepiandrosteron-ein neuer
GREGOROVA, J.: Zutritt zur Pathogenese der Obesität.
 Endokrinologie, Lpz. 43 (1962),
206-214
87. SONKA, J., Defekt des DHEA's - Ein neues
GREGOROVA, J., Syndrom?
JIRANEK, M., Endokrinologie 47 (1965), 152-161
KÖLBEL, F.,
MATYS, Z.:
88. TAM, J., Über Blutsteroides II. Papier-
BECKMANN, J., chromatographische Untersuchungen
VOIGT, K.D.: am peripheren menschlichen Blut-
 plasma.
Acta endocr. 27 (1958), 403-414

89. TREIBER, L.,
OERTEL, G.W.: Zur Bestimmung von Ketosteroiden
mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin.
I. Beschreibung der Methode.
Zschr. klin. Chem. u. klin. Biochem.
5 (1967), 83-86
90. TREIBER, L.,
OERTEL, G.W.: Bestimmung von Ketosteroiden mittels
der 2,4-Dinitrophenylhydrazin-
Reaktion. In: 13. Symposion der
Deutschen Gesellschaft für Endo-
krinologie, Würzburg 2.-4. März 1967,
S. 287-290.
Berlin, Heidelberg, New York 1968
91. TREIBER, L.,
RINDT, W.,
OERTEL, G.W.: Zur Bestimmung von Ketosteroiden mit
2,4-Dinitrophenylhydrazin. II. An-
wendung der Methode bei Plasma-
analysen.
Zschr. klin. Chem. u. klin.
Biochem. 5 (1967), 102-106
92. TSUTSUI, E.A.,
MARKS, P.A.,
REICH, P.: Effects of dehydroepiandrosterone
on glucose-6-phosphate-dehydrogenase
activity and reduced triphosphorylidi-
ne nucleotide formation in adrenal
tissue.
J. biol. Chem. 237 (1962),
3.009-3.013
93. UHLENBUCH, G.,
PARDOL, G.J.: Die Struktur der Erythrocytenober-
fläche I. Internist. Symposium,
Wien 1968.
Thieme Verl. 342

94. UNGAR, F., Incorporation of C₁₄ in urinary
DORFMANN, R.J.: steroids in vivo.
J. biol. Chem. 205 (1953),
125-132
95. VILLEE, D.B., Steroid biosynthesis by human
LORING, J.M., fetal adrenals.
VILLEE, C.A.: Fed. Proc. 18 (1959), 344
96. WARREN, J.C., Distribution of steroid sulfatase
FRENCH, A.P.: in human tissue.
J. clin. Endocr. Metab. 25 (1965),
278-282
97. WOTIZ, H.H., Studies in the steroid metabolism;
DAVIS, J.W., conversion of testosterone-4-C₁₄
LEMON, H.M., to estrogens by human ovarian
GUT, M.: tissue.
J. biol. Chem. 222 (1956), 487-495

LEBENS LAUF

Am 17.10.1944 wurde ich, Raphael Shimshoni, als Sohn des Eliah Yacob Shimshoni und seiner Ehefrau Sarah, geb. Ber-
mann, in Tel-Aviv geboren.

1947 Umzug nach Prag in die Tschechoslowakei. Von 1950
bis 1955 besuchte ich die Volksschule in Warnsdorf, von
1955 bis 1958 die Mittelschule in Prag und am 14.6.1961
legte ich die Reifeprüfung in Warnsdorf ab.

Mein Medizinstudium begann ich im Wintersemester 1965 an
der Karl-Universität in Prag, wo ich 1966 das Vorphysikum
und 1967 das Physikum bestand.

Am 30. August 1968 kam ich nach Deutschland. Nach Anerken-
nung des Physikums konnte ich im Wintersemester 1969 mein
Studium an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz fort-
setzen.

Am 6. Dezember 1972 schloß ich, ebenfalls an der Johannes
Gutenberg-Universität in Mainz, mein Studium mit dem
Medizinischen Staatsexamen erfolgreich ab.

Zur Zeit leiste ich an den Universitätskliniken in Mainz
meine einjährige Medizinalassistentenzeit ab.

Ich bin verheiratet. Meine Ehefrau Varda, geb. Zingisser
ist Soziologin und arbeitet in der Evangel. Theologischen
Fakultät.

Herrn Professor Dr. med. Volker Friedberg,
Direktor der Universitäts-Frauenklinik Mainz,
bin ich für die Arbeitsmöglichkeit an seiner
Klinik zu Dank verpflichtet.

Herrn Professor Dr. rer. nat. Georg W. Oertel,
Abteilungsvorsteher der Abteilung für experi-
mentelle Endokrinologie Mainz, danke ich recht
herzlich für die Überlassung des Themas, sowie
die wertvollen Ratschläge und Diskussion zu
dieser Arbeit.

Herrn Dipl.-Chem. Peter Benes, danke ich viel-
mals für die Anregungen bei der Durchführung
des experimentellen Teiles der Arbeit.

